家蚕磷酸吡哆醇氧化酶基因的表达谱分析

葛俊楠[1]，张剑韵[2]，黄龙全[1,*]
（1. 安徽农业大学茶与食品科技学院，合肥 230036；2. 安徽农业大学生命科学学院，合肥 230036）

摘要：【目的】了解家蚕 *Bombyx mori* 维生素 B_6 关键代谢酶磷酸吡哆醇氧化酶(pyridoxine-5′-phosphate oxidase, PNPO)基因在家蚕不同发育阶段及5龄幼虫不同组织中的表达差异。【方法】将家蚕 PNPO 基因的重组表达质粒 pET-22b(+)-*PNPO* 转化入大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta 中诱导表达，纯化蛋白制备多克隆抗体。分别采用荧光定量 PCR 和 Western blot 方法对家蚕 PNPO 基因进行了转录水平和翻译水平的表达分析。【结果】在家蚕发育水平上，5龄幼虫的 PNPO 翻译量为最高。PNPO 基因在5龄幼虫各组织中的转录水平由高到低依次为精巢、头、中肠、马氏管、卵巢、表皮、脂肪体、丝腺；翻译量也以精巢为最高，其次是头、中肠和马氏管。【结论】明确了 PNPO 在家蚕各发育阶段及5龄幼虫各组织中的表达情况。

关键词：家蚕；磷酸吡哆醇氧化酶；Western blot；荧光定量 PCR；表达谱
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2011)08-0877-04

Expression profiling of pyridoxine 5′-phosphate oxidase gene in *Bombyx mori*

GE Jun-Nan[1], ZHANG Jian-Yun[2], HUANG Long-Quan[1,*] (1. College of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: 【Aim】The expression profile of gene encoding pyridoxine phosphate oxidase (PNPO), which is a key enzyme related to VB_6 metabolism, was analyzed in different developmental stages and tissues of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*. 【Methods】The recombinant plasmid pET-22b(+)-*PNPO* was transformed to *Escherichia coli* Rosetta for induction, expression and purification of PNPO, and then the polyclonal antibody was prepared. The expression profile of PNPO gene was analyzed by Real-time PCR and Western blot, respectively. 【Results】The highest translation level of PNPO gene was found in the 5th instar larvae. The transcription level in tissues of 5th instar larvae was in sequence of testis > head > midgut > Malpighian tubules > ovary > cuticle > fat body > silk glands. However, the highest translation level was found in testis, and then was in head, midgut, and malpighian tubules, respectively. 【Conclusion】The expression profile PNPO gene in *B. mori* has been defined by this study.

Key words: *Bombyx mori*; pyridoxine 5′-phosphate oxidase; Western blot; real-time PCR; expression profile

磷酸吡哆醛(pyridoxal 5′-phosphate, PLP)是维生素 B_6(vitamin B6, VB_6)的主要辅酶形式，除参加催化涉及氨基酸代谢的各种反应外，还与细胞其他多种生理活动有关(Kerry and Kwok, 1986)。磷酸吡哆醇氧化酶(pyridoxine phosphate oxidase, PNPO)在黄素单核苷酸(flavin mononuleotide, FMN)和 O_2 的存在下，催化磷酸吡哆醇(pyridoxine 5′-phosphate, PNP)、磷酸吡哆胺(pyridoxamine-5′-phosphate, PMP)形成 PLP(Zhao and Winkle, 1995)。PNPO 是生物体内 VB_6 代谢调控的关键点(Merrill *et al.*, 1978; di Salvo *et al.*, 1998)。Kazarinoff 和 McCormick(1975)首先从兔肝中纯化出 PNPO；随后老鼠、猪脑、羊中的 PNPO 也得到了纯化(Cash *et al.*, 1980; Churchich, 1984; Choi *et al.*, 1987)。近年来关于 PNPO 的作用机制和空间结构也有报道(Loubbardi *et al.*, 1995; di Salvo *et al.*, 2002 ; Musayev *et al.*, 2003; Pédelacq *et al.*, 2006)。

家蚕属 VB_6 异养型生物，但其体内 VB_6 的转换代谢与哺乳动物相比存在较大差异(张剑韵和黄龙全, 2003a)。VB_6 与家蚕生长发育、丝蛋白合成以及氨基酸代谢等过程密切相关(张剑韵和黄龙

基金项目：国家自然科学基金项目(30870338)
作者简介：葛俊楠，男，1986年生，安徽蚌埠人，硕士研究生，研究方向为食品科学，E-mail: gejunnan-123@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lqhuang218@yahoo.com.cn
收稿日期 Received: 2011-05-20；接受日期 Accepted: 2011-06-17

全，2003b）。本研究室克隆出家蚕 PNPO cDNA（GenBank 登录号：ABE28379），并对家蚕 PNPO 基因和蛋白结构进行了分析（张剑韵等，2008）。本研究采用荧光定量 PCR 和 Western blot 方法对 PNPO 基因在家蚕体内的表达进行了分析，结果有助于进一步探讨 PNPO 基因的表达与丝蛋白的合成之间可能存在的联动调节机制。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

家蚕在自然条件下用桑叶喂养，5 龄幼虫于 －80℃冰箱中保存备用。重组质粒 pET -22b（＋）-*PNPO* 由本研究室（张剑韵等，2008）构建，大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta 表达菌株为本研究室保存。蛋白质 Marker 购自全式金公司。硝酸纤维素膜、Triton X-100、IPTG 购自上海生物工程公司。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司；弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司；Reverse Transcriptase M-MLV（RNase H^-）、SYBR® Premix Ex Taq™购自 TaKaRa 公司；山羊抗兔 Ig G-HRP 购自中杉金桥公司；超敏 ECL 化学发光试剂盒购自碧云天公司；雄性兔子购自安徽医科大学动物房。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 家蚕重组 PNPO 的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备

参照王振等（2010）的方法进行 PNPO 的原核表达。经超声破碎的菌液 8 000 r/min 离心 30 min 后用含 Triton X-100 的洗涤液悬浮沉淀，离心 10 min 后用含 4 mol/L 尿素的洗涤液洗涤沉淀并再次离心，最后用含 8 mol/L 尿素的溶解液溶解沉淀，离心后的上清即为纯化的包涵体蛋白。

将纯化后蛋白与样品缓冲液混合，沸水浴 5 min 后 12 000 r/min 离心 5 min 备用。经 SDS-PAGE 后用 0.5 mol/L KCl 染色（谭振等，2009）。将目的蛋白条带切下用 PBS 充分研磨后与等体积弗氏完全佐剂充分乳化，采用皮下多点注射法对兔子进行初次免疫。两周后加强免疫，以后每隔 7 d 加强免疫一次，共 4 次。间接 ELISA 方法检测抗体效价，达到 Western blot 对于抗体效价的要求后大量取血。

1.3 抗体特异性检测

取纯化后的家蚕重组 PNPO 200 μg，按 4∶1（V∶V）与上样缓冲液混匀后煮沸 5 min，进行 SDS-PAGE（浓缩胶 5%，分离胶 12.5%）分析，Bradford 法测定蛋白浓度。半干转印法将胶上蛋白转移至硝酸纤维素膜（NC 膜）上，丽春红染色后剪下带有目的蛋白的条带，浸入含有 0.5% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭 2 h，在 1∶1000 稀释的一抗中孵育 1 h。取出 NC 膜，PBST 洗涤 3 次，每次 10 min。二抗孵育 1 h 后 PBST 洗涤 3 次，每次 10 min。将 ECL 混合液均匀涂布在 NC 膜上，反应 1 min，暗盒中曝光。

1.4 家蚕 PNPO 基因翻译水平分析

分别提取家蚕 5 龄第 5 天幼虫的头部、脂肪体、中肠、马氏管、卵巢、丝腺、表皮和精巢 8 个组织及卵、4 龄幼虫、5 龄幼虫、成虫和蛹 5 个发育时期的总蛋白，用 Western blot 方法检测 PNPO 在 8 个组织和 5 个发育时期的表达情况。

1.5 家蚕 PNPO 基因转录水平分析

按照 Trizol 试剂盒说明书分别提取家蚕 5 龄第 5 天幼虫的头部、脂肪体、中肠、马氏管、精巢、丝腺、表皮和卵巢 8 个组织的总 RNA，采用 DNase Ⅰ（RNase free）消化基因组 DNA，RT-PCR 的方法研究 PNPO 基因在家蚕 5 龄幼虫不同组织的转录水平。根据家蚕 PNPO 基因序列设计引物，同时选 18 S rRNA 的一对引物作为内参。

引物序列如下：PNPO 上游引物为 5′-CAGCGCCTTTATGGACAA-3′，下游引物为 5′-TATGATAGCGGACATCTCGT-3′；18 S rRNA 上游引物为 5′-CGATCCGCCGACGTTACTACA-3′，下游引物为 5′-GTCCGGGCCTGGTGAGATTT-3′。

按照 Reverse Transcriptase M-MLV（RNase H^-）的说明书合成第一链 cDNA。利用 SYBR® Premix Ex Taq™试剂进行荧光定量 PCR 反应，采用 BIO-RAD iQ5 实时荧光定量 PCR 仪进行检测。检测结果按相对定量法计算，目的基因相对表达量计算公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$。

2 结果

2.1 PNPO 多克隆抗体的制备和特异性鉴定

重组质粒 pET-22b（＋）-*PNPO* 经 IPTG 诱导表达后，重组蛋白以包涵体的形式存在。纯化、溶解包涵体，重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后（图 2）用 quantity one 软件进行灰度分析，纯度约为 75%。免疫结束用间接 ELISA 方法检测效价为 1∶30000。Western blot 鉴定抗体特异性，得到一条特异性条带（图 2），说明所制备的一抗对重组蛋白有较好的特异性。

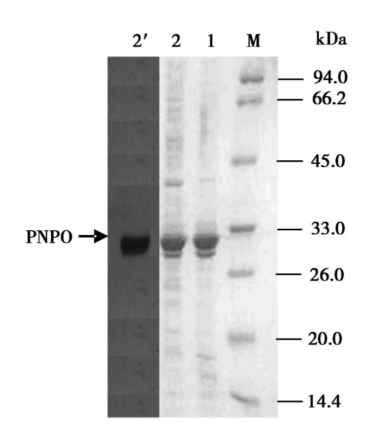


图 1　纯化后 PNPO 的 SDS-PAGE 检测

Fig. 1　SDS-PAGE of purified PNPO

1：4 mol/L 尿素的洗涤液洗下的蛋白 The eluted enzyme by 4 mol/L urea；2：纯化后的目的蛋白 Purified PNPO；2′：第 2 泳道对应的 Western blot 结果 The Western blot result of lane 2；M：低分子量蛋白标准物 Protein molecular weight marker.

2.2　家蚕 PNPO 基因翻译水平分析

采用 Western blot 对家蚕 5 龄幼虫的 8 个组织和 5 个发育时期总蛋白中的 PNPO 表达量进行分析，结果表示：在发育水平上 5 龄幼虫 PNPO 的表达量为最高（图 2）；PNPO 在 5 龄幼虫的精巢、头、中肠和马氏管中都有明显表达，以精巢的表达量为最高（图 3）。

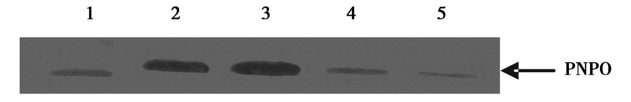


图 2　家蚕 5 个发育时期中 PNPO 基因的表达水平

Fig. 2　The expression level of PNPO gene in different developmental stages of *Bombyx mori*

1：卵 Egg；2：4 龄幼虫 4th instar larva；3：5 龄幼虫 5th instar larva；4：成虫 Moth；5：蛹 Pupa.

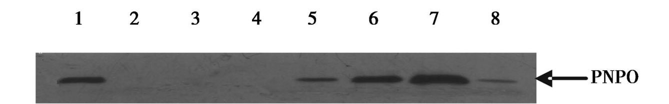


图 3　家蚕 5 龄幼虫各组织中 PNPO 基因的表达水平

Fig. 3　The expression level of PNPO gene in different tissues of the fifth instar larva of *Bombyx mori*

1：头 Head；2：表皮 Cuticle；3：丝腺 Silk glands；4：脂肪体 Fat body；5：马氏管 Malpighian tubules；6：中肠 Midgut；7：精巢 Testis；8：卵巢 Ovary.

2.3　家蚕 PNPO 基因转录水平分析

荧光定量 PCR 结果表明，PNPO 基因在家蚕 5 龄幼虫的卵巢、表皮、精巢、丝腺、头、中肠、脂肪体、马氏管 8 个组织中的转录水平存在较大的差异，由高到低依次为：精巢、头、中肠、马氏管、卵巢、表皮、脂肪体、丝腺（图 4）。

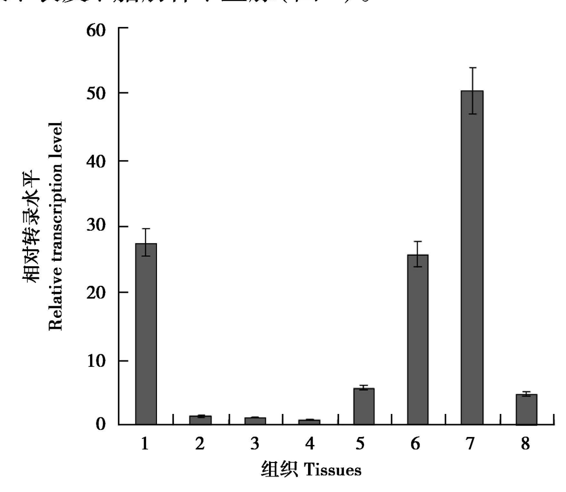


图 4　家蚕 5 龄幼虫各组织中 PNPO 基因的转录水平

Fig. 4　The transcription level of PNPO gene in different tissues of the fifth instar larvae of *Bombyx mori*

1：头 Head；2：表皮 Cuticle；3：丝腺 Silk glands；4：脂肪体 Fat body；5：马氏管 Malpighian tubules；6：中肠 Midgut；7：精巢 Testis；8：卵巢 Ovary.

3　讨论

本研究结合荧光定量 PCR 和 Western blot 技术对 PNPO 基因在家蚕不同发育时期和 5 龄幼虫组织水平上的表达进行了分析。PNPO 基因的组织转录水平由高到低依次为：精巢、头、中肠、马氏管、卵巢、表皮、脂肪体、丝腺；翻译水平由高到低依次为：精巢、头、中肠和马氏管，表现出相同的趋势。在蛋白表达水平上，从丝腺组织未检测到 PNPO 的明显表达，可能是因为丝腺组织的总蛋白含量高，而 Western blot 方法检测的标准是各组织总蛋白量相同，这样就导致丝腺组织中 PNPO 的含量相对低下，以致未能明显检测出 PNPO 的表达。

参 考 文 献（References）

Cash CD, Maitre M, Rumigny JF, Mandel P, 1980. Rapid purification by affinity chromatography of rat brain pyridoxal kinase and pyridoxamine-5-phosphate oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 96(4): 1755－1760.

Choi SY, Churchich JE, Zaiden E, Kwok F, 1987. Brain pyridoxine-5′-phosphate oxidase. Modulation of its catalytic activity by reaction with pyridoxal 5-phosphate and analogs. *Journal of Biological Chemistry*, 262(25): 12013－12017.

Churchich JE, 1984. Brain pyridoxine-5-phosphate oxidase. A dimeric enzyme containing one FMN site. *European Journal of Biochemistry*, 138(2): 327－332.

di Salvo M, Yang E, Zhao G, Winkler ME, Schirch V, 1998. Expression, purification, and characterization of recombinant *Escherichia coli* pyridoxine 5′-phosphate oxidase. *Protein Expression and Purification*, 13(3): 349 – 356.

di Salvo ML, Ko TP, Musayev FN, Raboni S, Schirch V, Safo MK, 2002. Active site structure and stereospecificity of *Escherichia coli* pyridoxine-5′-phosphate oxidase. *J. Mol. Biol.*, 315: 385 – 397.

Kazarinoff MN, McCormick DB, 1975. Rabbit liver pyridoxamine (pyridoxine) 5′-phosphate oxidase: Purification and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 250(9): 3436 – 3442.

Kerry JA, Kwok F, 1986. Purification and characterization of pyridoxal kinase from human erythrocytes. *Preparative Biochemistry*, 16(3): 199 – 216.

Loubbardi A, Marcireau C, Karst F, Guilloton M, 1995. Sterol uptake induced by an impairment of pyridoxal phosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Cloning and sequencing of the *pdx3* gene encoding pyridoxine (pyridoxamine) phosphate oxidase. *Journal of Bacteriology*, 177(7): 1817 – 1823.

Merrill AH, Horiike K, McCormick DB, 1978. Evidence for the regulation of pyridoxal 5′-phosphate formation in liver by pyridoxamine (pyridoxine) 5′-phosphate oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 83(3): 984 – 990.

Musayev FN, di Salvo ML, Ko TP, Schirch V, Safo MK, 2003. Structure and properties of recombinant human pyridoxine 5′-phosphate oxidase. *Protein Sci.*, 12(7): 1455 – 1463.

Pédelacq JD, Rho BS, Kim CY, Waldo GS, Lekin TP, Segelke BW, Rup PB, Hung LW, Kim S, Terwilliger TC, 2006. Crystal structure of a putative pyridoxine 5′-phosphate oxidase (Rv2607) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteins*, 62(3): 563 – 569.

Tan Z, Tong X, Fang C, Jiang CJ, Chen C, 2009. Prokaryotic expression of α-tubulin gene of *Camellia sinensis* and preparation of α-tubulin polyclonal antibody. *Journal of Tea Science*, 29(5): 336 – 340. [谭振，童鑫，房超，江昌俊，陈聪，2009. 茶树 α-tubulin 基因的原核表达及其克隆抗体的制备. 茶叶科学，29(5): 336 – 340]

Wang Z, Zhang JY, Huang LQ, 2010. Expression of *Bombyx mori* pyridoxine-5′-phosphate oxidase in *E. coli* and assay of enzymological characters. *Science of Sericulture*, 36(3): 503 – 506. [王振，张剑韵，黄龙全，2010. 家蚕磷酸吡哆醇氧化酶在 *E. coli* 中的表达及酶学特征研究. 蚕业科学，36(3): 503 – 506]

Zhang JY, Huang LQ, 2003a. Distribution, movement and metabolism of vitamin B_6 compounds in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 46(3): 277 – 281. [张剑韵，黄龙全，2003a. 家蚕体内维生素 B_6 的存在形态和转换代谢. 昆虫学报，46(3): 277 – 281]

Zhang JY, Huang LQ, 2003b. Effects of vitamin B_6 deficiency on the amino acid metabolism, fatty acid metabolism and aminotransferase activity of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 46(4): 436 – 440. [张剑韵，黄龙全，2003b. 家蚕体内因缺乏维生素 B_6 而引起的若干代谢变动. 昆虫学报，46(4): 436 – 440]

Zhang JY, Shi RJ, Huang LQ, 2008. Cloning, expression and genomic organization of the cDNA encoding pyridoxal kinase in *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 51(2): 113 – 119. [张剑韵，石瑞君，黄龙全，2008. 家蚕吡哆醛激酶 cDNA 的克隆、表达和基因结构分析. 昆虫学报，51(2): 113 – 119]

Zhao GS, Winkler ME, 1995. Kinetic limitation and cellular amount of pyridoxine (pyridoxamine) 5′-phosphate oxidase of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 177(4): 883 – 891.

(责任编辑：赵利辉)